

4996143

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-157570

⑤ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	④ 公開 昭和62年(1987)7月13日
G 01 N 33/50		P-8305-2G	
C 12 Q 1/68		8412-4B	
G 01 N 21/64		Z-7458-2G	
21/76		8305-2G	
// C 12 N 15/00		7115-4B	審査請求 未請求 発明の数 1 (全12頁)

④ 発明の名称 標的一本鎖ポリヌクレオチド配列を検出するための分光学的方法

⑪ 特 願 昭61-305611

⑫ 出 願 昭61(1986)12月23日

優先権主張 ⑬ 1985年12月23日 ⑭ 米国(US) ⑮ 812111

⑯ 発 明 者 マイケル・ジェイ・ヘ アメリカ合衆国、カリフォルニア州、ボーウェイ、アクト  
ラー⑰ 発 明 者 エドワード・ジェイ・ アメリカ合衆国、カリフォルニア州、サン・ディエゴ、ノ  
ジャブロンスキー ースリム・コート 1535、ナンバー 257⑱ 出 願 人 モレキュラー・バイオ アメリカ合衆国、カリフォルニア州、サン・ディエゴ、ロ  
システムズ・インコー ーゼル・ストリート 11180、スイート・エイ  
ポレイテッド

⑲ 代 理 人 弁理士 曾我 道照 外3名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

標的一本鎖ポリヌクレオチド配列を検出する  
ための分光学的的方法

## 2. 特許請求の範囲

1. (i) 標的一本鎖ポリヌクレオチド配列に対して相補的な1個の蛍光ポリヌクレオチドプローブ配列を前記標的一本鎖ポリヌクレオチド配列へ交雑させるか、または(ii) 前記標的一本鎖ポリヌクレオチド配列の逐次隣接する帯域に対して相補的な複数の蛍光ポリヌクレオチドプローブ配列を交雑させることからなるポリヌクレオチド試料中の標的一本鎖ポリヌクレオチド配列を検出するための分光学的的方法において、前記1個または複数のプローブ中に核酸塩基単位ヘリンカーアームにより接続している少なくとも一対の蛍光成分を存在させ、該蛍光成分はそれぞれ供与体成分の発光スペクトルが受容体成分の励起スペクトルと重複して受容体蛍光団により効率的に蛍光発光することにより非照射性エネルギー転移を可能にす

るように選択された供与体成分及び受容体成分よりなり、受容体成分の発光スペクトルの最大波長が受容体成分の励起スペクトルの最大波長より少なくとも100nm大きく、前記リンカーアームが長さ4〜30Åをもち、供与体成分及び受容体成分を前記1個のプローブ中で非隣接的に塩基単位へ接続させるか、または前記複数のプローブ中で該プローブの3'末端単位及び5'末端単位以外の塩基単位へ接続させ、前記1個のプローブまたは前記複数のプローブを標的試料に交雑させる場合には、前記供与体成分及び受容体成分が接続している塩基単位が標的一本鎖ポリヌクレオチド配列のヌクレオチド塩基単位を2〜7個間隔を空けることにより分離した標的一本鎖ポリヌクレオチド配列の塩基単位へ交雑により対を為していることを特徴とするポリヌクレオチド試料中の標的一本鎖ポリヌクレオチド配列を検出するための分光学的的方法。

2. 供与体成分及び受容体成分が1個のプローブ上にある特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 供与体成分及び受容体成分が一对のアローブ上にある特許請求の範囲第1項記載の方法。
4. 供与体成分がフルオレセインであり、受容体成分がテキサスレッドである特許請求の範囲第1項から第3項までのいずれか1項に記載の方法。
5. 1個または2個のアローブを標的一本鎖ポリヌクレオチド配列へ交雑させる場合に、供与体成分及び受容体成分へ接続する塩基単位が3～6個の塩基単位により間隔を空けることにより分離される標的一本鎖ポリヌクレオチド配列のヌクレオチド塩基単位と対を為す特許請求の範囲第1項記載の方法。
6. アローブが長さ10～100個の塩基単位の合成ポリヌクレオチドであり、リンカーアームが10～25Aの長さをもつ特許請求の範囲第1項記載の方法。
7. 供与体成分及び受容体成分が1個のアローブ上にある特許請求の範囲第6項記載の方法。
8. 供与体成分及び受容体成分が一对のアローブ上にある特許請求の範囲第6項記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 発明の分野

本発明の分野はポリヌクレオチド(DNAまたはRNA)交雑測定に使用するための蛍光体で標識付したポリヌクレオチドアローブにある。一般的には、本発明は交雑測定装置においてより高感度で交雑を検出するために蛍光標識アローブの特性向上方法に関し、更に詳細には、有効エネルギー移動機構が顕著に改善させた検出特性をもつ1個または2個以上の蛍光アローブを生ずる1種または2種以上の蛍光体の選択及び特異的な配置に関する。

#### 発明の背景

交雑測定はDNA配列またはRNA配列を決定または同定するために使用することができる。特に、組換えDNAの研究に使用されるような公表されている方法はメソッズ・イン・エンチモロジー(Method in Enzymology)第68巻、第379～469頁(1979年);及び同第65巻パート1、第468～478頁(1968年)に記載され

9. 供与体成分がフルオレセインであり、受容体成分がテキサスレッドである特許請求の範囲第6項から第8項までのいずれか1項に記載の方法。
10. 供与体成分及び受容体成分が1個のアローブ上にあり、該アローブの3'末端単位及び5'末端単位以外の塩基単位へ塩基単位3～6個間隔を明けることにより分離されて接続している特許請求の範囲第1項から第6項までのいずれか1項に記載の方法。
11. 供与体成分及び受容体成分がそれぞれ標的一本鎖ポリヌクレオチド配列の隣接する塩基単位へ交雑された3'末端単位及び5'末端単位をもつ一对のアローブ上にあり、該交雑を行なう場合には、供与体成分及び受容体成分が4～6個塩基単位の間隔を空けることにより分離される特許請求の範囲第1項から第6項までのいずれか1項に記載の方法。
12. 供与体成分がフルオレセインであり、受容体成分がテキサスレッドである特許請求の範囲第10項または第11項記載の方法。

ている。電気泳動による核酸断片の予備分離を含む上述の方法の1つは「サザン・ブロット・フィルター・ハイブリダイゼーション・メソッド(Southern Blot Filter Hybridization Method)」として既知である。イー・サザン(E. Southern)のジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.)第98巻、第503頁(1975年)を参照されたい。核酸交雑方法及び操作の最近のより完全な報告はメインコース・ジェー(Meinkoth, J.)及びワール・ジー(Wahl, G.)のアナリティカル・バイオケミストリー(Analytical Biochemistry)第138巻、第267～284頁(1984年)に見ることができる。

蛍光標識合成ポリヌクレオチドアローブは米国において商業的に入手できる。変成したヌクレオチド類を合成ポリヌクレオチド類へ組込むための化学的方法は1985年8月30日付で公開されたPCT出願NO 84/03285明細書中に記載されている。次に、変成したヌクレオチド(通常、リンカーアームヌクレオチドと称される)を含有す

る合成ポリヌクレオチドを蛍光体成分により誘導することができる。上述のPCT出願に記載されているように、蛍光成分のみがプローブへ結合している。

フルオレセイン、ローダミン、ビレン類のような工業的に入手できる蛍光団により標識されたポリヌクレオチドプローブを使用する場合に、ある問題点に遭遇する。最も深刻な問題点は測定装置でプローブを直接検出するための限定された感度を包含する。ほとんどの交差測定において、標識プローブの少なくとも $10^{-11}$ モル( $10^6$ 個の標識分子)の感度すなわち検出レベルが必要である。多くの蛍光団は元来このレベルの感度をもつが、試料及び測定装置中の要素からの二次的な障害がこれらのレベルの感度を達成することを妨害する。蛍光プローブ $10^{-11}$ モルのレベルで、試料自体からの蛍光、レイリー散乱、支持体(ニトロセルロースフィルター等)からの反射及び特にラマン(水散乱)は蛍光プローブからの信号より幾桁も高いバックグラウンド信号を生ずることがある。

光団間の分離距離についての転移効率の方程式を見出したフェルスター(Forster)により提唱された。例えば、T.h.フェルスターのAnn. Phys. [西ドイツ、ライプチヒ(Leipzig)]第2巻(1948年)の第55~75頁を参照されたい。フェルスターの非照射性エネルギー転移の最近の要約はジェー・アール・ラコウィッチ(J.R. Lakowicz)の「プリンシパルス・オブ・フルオレセント・スペクトロスコピー(Principles of Fluorescent of Spectroscopy)」(1983年)の第10章に記載されている。フェルスターの数学的分析は蛍光体成分の距離が近ければ近い程、エネルギー転移効率が大きいことを基本としている。これまでの実験的証拠は上述の基本を確実なものにした。

ストリアー(Stryer)及びハーグランド(Haugland)の[Proc. Natl. Acad. Sci. 第58巻第719~729頁(1967年)]はオリゴヌクレオチド類へ結合したエネルギー供与体と受容体の対について種々の間隔を用いた実験が報告された。エネルギー供与基とエネルギー受容基は区画された

理想的には、上述の測定装置中での蛍光プローブの検出における改善は①大きなストークスシフトすなわち最大励起(EX)の波長と最大放射(EM)の大きな分離距離；②高量子収率(QY $\geq 0.5$ )；③高消衰係数(EC $\geq 30,000$ )；④600nm以上の放射光(赤色蛍光体)；及び⑤レーザー線に近い最大励起波長(442nmヘリウム-カドミウムまたは448nmアルゴン)をもつ蛍光団を選択することにより得ることができる。不幸にも、上述の基準を完全に満足する一般的な蛍光団はない。例えば、フルオレセイン(EX:495nm、EM:525nm、QY=0.5)はレーザー線に近い最大励起をもつ高度な蛍光標識であるが、ストークスシフトはわずかに約30nmである。

大きなストークスシフトはオーバーラップスペクトルをもち且つ供与体蛍光団と受容体蛍光団の間の非照射性エネルギー転移について最も近接した位置に配置されている一対の供与体/受容体蛍光団を使用することにより得ることができることが知られている。この形態のエネルギー転移は蛍

長さのスペーサーとして働くアロリンオリゴマー類の末端へ結合していた。1~12単位の間隔が12~46Åの分離範囲により試験された。より長いオリゴマー類はヘリックス構造であることが観察された。エネルギー転移効率は12Åの間隔での100%から46Åの間隔での16%へ減少した。転移効率の距離への依存はフェルスター方程式により示される依存性と非常に一致していた。得られた結果は上述の著者が分光学的定規として非照射性エネルギー転移の使用を提唱した理論的な予言と非常に良く近似していた。転移効率の距離への依存性は他の研究者により報告されたモデル装置を用いた関連する実験により追認されている。例えば、ガボアー(Gabor)のバイオポリマース(Biopolymers)第6巻(1968年)の第809~816頁及びカチルスキー-カッチャー(Katchalski-Katzir)らのAnn. N.Y. Acad. Sci. 第366巻(1981年)の第44~61頁を参照されたい。フェルスターエネルギー転移効率の使用は以下の免疫蛍光体測定方法の特許明細書に記載さ

れている。(米国特許第3,996,345号、同第3,998,943号、同第4,160,016号、同第4,174,384号及び同第4,199,599号明細書を参照されたい)。上述の特許明細書に記載されているエネルギー転移免疫蛍光体測定方法は受容蛍光体による蛍光再放出ではなく供与蛍光体の減少または消光に基づくものである[ウールマン・イー・エフ(Ullman, E. F.)らのジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)第251巻、14(1976年)の第4172~4178頁]。

化学ルミネッセンス標識または生物発光蛋白質に基づく均質免疫検定操作はパテル(Patel)らのクリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)第29巻(9)(1983年)の第1604~1608頁及び1985年4月17日に公告された欧州特許出願0137515号明細書に見られるように非照射性エネルギー転移を包含することが報告されている。高転移効率についての非照射性エネルギー転移の原理によって供与基-受容基の間隔を近接させることにより、均質免疫測定を行なうことができる

あるかまたは全くない標識された端部で標的ポリヌクレオチドの隣接する相補的配列へ交雑させる。好適な供与体成分は化学ルミネッセンス触媒であり、吸収剤成分は蛍光団またはリン光体である。

#### 発明の概要

本発明はポリヌクレオチド類(DNAまたはRNA)がポリヌクレオチドプローブへ結合した供与体-受容体蛍光体成分間の非照射性エネルギー転移に強く影響を及ぼす環境を提供するという知見に1部分基づくものである。本発明以前には、ポリヌクレオチド類を実際に且つ効率的に使用するために、特に、受容体蛍光団による効率的な発光に関して供与体-受容体成分をもつ蛍光団標識プローブをどのように設計するかは知られていなかった。蛍光体成分の新たな間隔がエネルギー転移を最大限にし且つ受容体による非常に効率的な発光を発光するために臨界的であることを見出した。驚くことに、最適な間隔は蛍光体成分が結合しているヌクレオチド間に介在する塩基対単位を必要とする。特に、フェルスターの非照射性エネルギー

転移が提唱されている。均質免疫測定は元来簡単に行なうことができるが、該測定の使用は未結合標識プローブが溶液中に残存し、障害となるバックグラウンド信号を生ずるために制限を受ける。1985年4月17日に公告された欧州特許出願0137515号は核酸-核酸相互作用を含む生物発光蛋白質類により使用することができる種々の配位子-配位子相互作用に関する。しかし、実施例は核酸類ではなく蛋白質配位子類を指向するものである。

1983年1月26日付で公告された欧州特許出願0070685号は互いに100Å以内に位置する吸収剤/蛍光体間の非照射性エネルギー転移を使用する均質核酸交雑測定法に関する。上述のように、交雑プローブは制限酵素切断によりDNAまたはRNAから誘導された一対の単鎖ポリヌクレオチド断片の3'及び5'末端単位へ吸収剤-蛍光体成分を結合させることにより調製される。一対のポリヌクレオチド断片を選択して標識された端部が重ならず且つ該端部間の塩基対間隔が僅か

でエネルギー転移のこれまでの知見と異なり、蛍光体成分を直接隣接するヌクレオチド単位(供与体/受容体の距離10~15Å)への結合または1個の介在単位のみをもつ蛍光体成分の結合は許容できない低転移効率となる。この新規な現象の理論的な説明は知られていない。しかし、1個または2個以上の蛍光体プローブが標的ポリヌクレオチドへ交雑する時の励起トラップの形成は明らかに関連がある。ヘリックス二本鎖ポリヌクレオチド類の上述の微環境は非照射性エネルギー転移及び受容体による効率的な蛍光の発光についての最適間隔で顕著な効果をもつ。

更に詳細には、効率的な受容体発光に関して、交雑時に供与体-受容体蛍光体成分が少なくとも2個で、7個を超えない介在塩基対により分離されるべきである。1個のプローブ場合または2個のプローブの場合に最適効率に関して、3個~6個の塩基単位の分離範囲が好適である。本発明の利点を最大限にするために、蛍光体成分を核酸(ピリミジンまたはプリン)塩基単位へ接続させるリ

ンカーアーム側鎖は4〜30人の範囲内、好適には約10〜25人の長さをもたねばならない。1個のプロープの場合または2個のプロープの場合に、蛍光体成分はプロープの末端単位へ結合してはならない。

本発明のプロープは以下に記載する理由のために特異であると思われる：①意外にも、フェスター方程式により予想され且つ最大エネルギー転移効率を提供するためにこれまで研究者により実験的に確認された上述の供与体と受容体の位置（例えば、20人またはそれ以下の距離）は交雑したポリヌクレオチドプロープについて観察された最小効率をもつことが見出された。②受容体による蛍光の発光に関して観察される最大エネルギー転移効率は比較的制限された数の位置にだけ蛍光体間のより広いヌクレオチド間隔を必要とすることが観察された。③また、観察される最大受容体蛍光団発光はプロープのその相補的配列への交雑に依存して観察され、すなわち1個のプロープの場合には、交雑により効率が上昇する。④適正な間

場合のように介在塩基単位をもつポリヌクレオチドへ結合する。本発明は通常3個のプロープ及び4個のプロープ並びに2個のプロープに適用できる。

1つの好適な実施態様は2個のポリヌクレオチドプロープの末端塩基単位付近に配置された蛍光団を利用するものである。両端の塩基単位への蛍光団の結合を回避することにより、適当な介在塩基単位が提供される。2個の蛍光団プロープの相補的配列への交雑は本発明の必要な間隔に従って供与体蛍光団及び受容体蛍光団を正確に配置することができる。

1個のプロープの場合において、供与体蛍光団及び受容体蛍光団は2個〜7個の介在塩基単位の相対的分離距離を提供する位置でポリヌクレオチドプロープへ結合させなければならない。2個のプロープの場合においてもまた、両プロープを標的配列へ交雑させた後に、片方のプロープ上の供与体蛍光団と他方のプロープ上の受容体蛍光団を2個〜7個の塩基単位の相対的分離距離を提供す

隔を用いると、受容体蛍光団による蛍光発光について例外的に高い値（すなわち80%）を得ることができる。

#### 好適な実施態様の記載

本発明は10〜100個の塩基単位、特に、15〜35個の塩基単位を含む合成ポリヌクレオチドプロープへ適用できる。合成プロープを用いる場合、蛍光団の正確な結合は1984年8月30日に公開されたP.C.T出願W0 84/03285に記載された方法により得ることができる。これはは必要なプロープの調製に関して本発明の実施を非常に簡略化するものである。

本発明の好適な実施態様は1個のポリヌクレオチドまたは2個のポリヌクレオチド中の所定の位置に配置されたに選択された供与体蛍光団及び受容体蛍光団を利用することにある。該プロープは大きなストークシフト及び600nm以上の波長で非常に効率的な供与体蛍光を発光するように設計することができる。1個のプロープの場合及び2個のプロープの場合において、蛍光団は交雑した

るように結合させなければならない。1個のプロープの場合及び2個のプロープの場合についての好適な分離間隔は3個〜6個の介在塩基単位である。最適な間隔は4〜5単位であると思われる。1個のプロープの場合及び2個のプロープの場合において、プロープを標的ポリヌクレオチドへ交雑させる場合には、供与体成分と受容体成分を接続させる塩基単位は2個〜7個の介在塩基単位により分離される標的試料の塩基単位と対を為さねばならない。

#### 蛍光団の選択

供与体蛍光団及び受容体蛍光団の選択は本発明の利点を得るために重要なことである。通常、蛍光成分は供与体成分の発光スペクトルが受容体成分の励起スペクトルと重なってそれらの間の効率的な非照射性エネルギー転移を提供するようにそれぞれ選択された供与体成分及び受容体成分を含むものでなければならない。受容体成分の発光スペクトルの最大波長は供与体成分の励起スペクトルの最大波長より少なくとも100nm高いもので

なければならない。

更に、蛍光供与体-蛍光受容体対は①高効率フエスターエネルギー転移；②大きな最終ストークシフト( $>100\text{nm}$ )；③可視スペクトルの赤色位置( $>600\text{nm}$ )への可能な限りの発光をシフトすること；及び④供与体励起波長での励起により生ずるラマン水蛍光発光より高い波長の発光をするように選択することが好ましい。例えば、供与体蛍光団はレーザー線に近い最大励起波長(特に、ヘリウム-カドミウム442nmまたはアルゴン488nm)、高消衰係数、高量子収率をもち、供与体の蛍光発光スペクトルは受容体蛍光団の励起スペクトルとよく重複するように選択できる。通常、受容体蛍光団は高消衰係数及び高量子収率をもち、受容体の励起スペクトルと供与体の発光スペクトルとが良好に重複し、且つ可視スペクトルの赤色部分( $>600\text{nm}$ )に発光するように選択することが好ましい。

フルオレセインは特に望ましい供与体成分である。また、ルシファーイエロー(Lucifer Yellow)

長である。フルオレセインリポーターグループの単独の使用と比較して、テキサスレッド受容体の併用は約490nmでの励起について615nm~620nmの発光領域での相対検出感度を10~20倍上昇させる。ルシファーイエローリポーターグループの単独の使用と比較して、テキサスレッド受容体の併用は615nm~620nmの発光領域での相対検出感度を2~3倍上昇させる。

フルオレセイン蛍光団はモレキュラー・プローブス・インコーポレーテッド(Molecular Probes Inc.)(米国、オレゴン州、ジャンクション・シティ)またはシグマ・ケミカル・コーポレーション(Sigma Chemical Co.)(米国、マサチューセッツ州、セントルイス)から得ることができるフルオレセインイソチオシアン酸塩誘導体としてポリヌクレオチドアプローブ中に組込むことができる。スルホローダミン(Sulforhodamine)101のテキサスレッドスルホンクロリド誘導体はモレキュラー・プローブス・インコーポレーテッドから得ることができる。また、テキサスレッドはティ-

も供与体成分として、特に、受容体成分としてテキサスレッドと併用して使用できる。フルオレセイン(EX約492nm、EM約520nm、EC約70,000、QY高)及びルシファーイエロー(EX約428nm、EM約540nm、EC約12,000、QY中位)の発光スペクトルはテキサスレッド(EX約590nm、EM約615nm、EC約70,000、QY高)の励起スペクトルと十分に重複する。フルオレセインの最大励起波長(約492nm)はアルゴンレーザー線の488nmと非常に近く、ルシファーイエローの最大励起波長(約428nm)はヘリウム-カドミウムレーザー線の442nmに非常に近くなって来る。更に、フルオレセイン/テキサスレッド及びルシファーイエロー/テキサスレッドの組み合わせはそれぞれ約130nm及び約170nmの大きなストークシフトを提供する。両方の場合において、615nm~620nmのテキサスレッド発光はラマン水線(448nmの励起について約585nm及び442nmの励起について約520nm)より顕著に高い波

長である。TitusらのJ. Immunol. Meth. 第50巻(1982年)の第193~204頁に記載されているようにスルホローダミン101をオキシ塩化リンと反応させることにより調製することができる。ルシファーイエローはアルドリッチ・ケミカル・コーポレーション(Aldrich Chemical Co.)(米国、ウィスコンシン州、ミルウォーキー)からビニルスルホン誘導体(ルシファーイエローVS)として得ることができる。ルシファーイエローVSは4-アミノ-N-[3-(ビニルスルホン)フェニル]ナフチルイミド-3,5-ジスルホン誘導体である。その使用方法の記載に関しては、スチワート・タブリュ(Stewart W)の**ノーチャ**(Nature)第292巻(1981年)の第17~21頁を参照されたい。

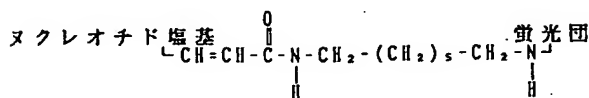
前述の記載はフルオレセインとテキサスレッドまたはルシファーイエローとテキサスレッドの組み合わせに本発明を限定するものではないことを理解されたい。本発明の原理により好適である組み合わせはより広い範囲に適用できる。本発明の簡略

特性は蛍光団の他の供与体-受容体対を利用することができる。例えば、供与体としてフルオレセイン及びルシファーイエローを用いる場合、以下の蛍光試薬から調製された受容体蛍光団成分が許容できる：リサミン・ローダミンB (Lissamine rhodamine B) スルホニルクロリド；テトラメチルローダミンイソチオシアネート；ローダミンXイソチオシアネート；及びエリトロシンイソチオシアネート。上述の受容体(テキサスレッドを含む)への他の適当な供与体はB-フェコエリトリン及び9-アクリジンイソチオシアネート誘導体である。

フルオレセインを受容体成分として使用した場合に、適当な供与体はルシファーイエローVS；9-アクリジンイソチオシアネート；4-アセトアミド-4'-イソチオシアネートスチルベン-2,2'-ジスルホン酸；7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアネートフェニル)-4-メチルクマリンから得ることができる。

ランタニドイオン類(ユーロピウム及びテルビ

ウム)。以下に記載するリンカーアームは上述のPCT明細書に記載されているような本発明に使用することができるリンカーアームを説明するものである。



上述のようなリンカーアームは鎖中に12単位を含み、約14Åの長さをもつ。本発明によりアローブを調製する際のこのリンカーアームの使用を実験例で更に説明する。

第1図及び第2図は好適な実施態様の図による説明を提供するものである。まず、第1図について記載すれば、5個のヌクレオチド塩基(n=5)間隔の蛍光団をもつ1個のアローブを示すものである。ポリヌクレオチドアローブは10~100個のヌクレオチド塩基を含む。アローブの5'末端及び3'末端の中間に、供与体蛍光団(D)及び受容体蛍光団(A)が4~30Åのリンカーアームを介して塩基単位に結合している。リンカーアーム

のジエチレントリアミンペンタアセテートまたは他のキレート化合物を受容体として使用する場合には、適当な供与体はスクシンイミジル-1-ピレン-ブチレート；及び4-アセトアミド-4'-イソチオシアネートスチルベン-2,2'-ジスルホン酸誘導体から得ることができる。

#### リンカーアーム

蛍光成分をアローブの塩基単位へ接続するリンカーアームの長さもまた本発明の利点を完全に得るための重要なパラメーターである。本発明において、リンカーアームの長さはプリン塩基またはピリミジン塩基に結合する内端と蛍光団へ接続する外端との間の距離として規定される。通常、リンカーアームは4~30Åの長さをもつ。リンカーアームの好適な長さは10~25Åである。リンカーアームはPCT出願NO 84/03285号明細書に記載されている種類のものであってもよい。該明細書はリンカーアームの選択されたプリン塩基またはピリミジン塩基への結合方法及び蛍光団のリンカーアームへの結合方法をも開示して

いる。アローブが蛍光団を接続する単位は5個のヌクレオチド塩基単位(+5)により分離される。DNAの塩基をアルファベットで示す：G=グアニン、T=チミン、A=アデニン、C=シトシン。矢印により示すように、アローブ上に向かう励起光は供与体蛍光団により吸収され、非照射性エネルギープロセスにより受容体蛍光団へ転移し、且つ受容体蛍光団により蛍光を発生する。

第2図は核酸試料の標的ポリヌクレオチド配列への2個のアローブの交雑を説明するものである。試料及びアローブはDNAの塩基(G、T、A及びC)を含有する。交雑した状態で、ヌクレオチド塩基は2本鎖DNA(G-C及びT-A)の方法で対を為す。記載する説明では、それぞれ25個のヌクレオチド塩基を含む。リンカーアームは交雑した時にアローブの隣接する3'末端及び5'末端から間隔をあけた塩基単位へ結合する。特に、テキサスレッド蛍光団はアローブ(1)の3'末端から3番目の単位であるチミン単位(T)へ結合する。フルオレセインはアローブ(2)の5'末端から5番

目の単位であるチミン(T)へ結合する。交雑に関して、これらの2個のプロープは図示するように供与体蛍光団と受容体蛍光団が結合している塩基単位間の分離が6単位( $n=6$ )である。リンカーアームは約14Åの長さを持ち、上述に説明したリンカーアームよりなる。

第3図及び第4図は1個の受容体蛍光団が多数の供与体蛍光団と間隔あけて配置されたプロープの変成を示すものである。これらの実施態様は塩基単位分離とリンカーアーム長さに関して上述したものと同様の間隔必要条件を使用するものである。第3図は受容体蛍光団プロープが4塩基単位( $n=4$ )だけ受容体蛍光団の塩基から離れている塩基へ結合している2個の受容体蛍光団の間に位置する中間の塩基へ結合する1個のプロープの実施態様を説明するものである。第4図は受容体蛍光団が1個のプロープへ結合し且つ受容体蛍光団と供与体蛍光団が他のプロープへ結合している2個のプロープの実施態様を説明するものである。説明したように、プロープ(1)はその3'末端から

目の塩基へ結合する受容体成分を持ち、このプロープ(2)の受容体成分は、交雑時にプロープ(3)の3番目の塩基に結合する供与体成分と対を為し、これら成分間に $n=4$ の間隔を与える。

#### 測定操作

本発明のプロープはDNAまたはRNA交雑測定に使用される上述の種類の不均質測定または均質測定に使用することができる。しかし、本発明の利点を最大とするために、プロープを標的DNAまたはRNAを支持体へ交雑させる不均質測定法と併用することが好ましい。標的配列を含む供試試料を多数の既知の操作のいずれか1つにより調製し、適当な固定化支持体へ結合させることができる。該操作はメソッド・オブ・エンチャーモロジー第66巻(1979年)の第379～469頁、同第65巻パート1(1980年)の第468～478頁及びアナリティカル・バイオケミストリー(Analytical Biochemistry)第138巻(1984年)の第267～284頁に記載されている。また、米国特許第4,358,539号明細書及

3番目の塩基へ結合した供与体蛍光団をもつ。プロープ(2)はその5'末端から3番目の塩基へ結合した受容体結合をもち且つ5'末端から8番目の塩基単位へ結合した供与体蛍光団をもつ。これは上述のプロープを第2図で説明したように標的配列へ交雑させる場合に、プロープ(2)の受容体蛍光団と供与体蛍光団の間に4個の塩基単位の間隔を提供する。同様の間隔( $n=4$ )はプロープ(1)の供与体蛍光団とプロープ(2)の受容体蛍光団の間に与えられるであろう。第3図及び第4図の供与体/受容体蛍光団配置によれば、受容体蛍光団への非照射性エネルギーの量を増加することができる。

第5図は2対の供与体蛍光団と受容体蛍光団を含む3個のプロープの実施態様を示すものである。プロープ(1)は5'末端から3番目の塩基へ結合する供与体成分を持ち、この供与体成分はプロープ(2)の3'末端から3番目の塩基へ結合する主要体成分と対を為し、それによって4塩基単位( $n=4$ )の分離が得られる。プロープ(2)の5'末端は3番

び公告された欧州特許0070685号及び同0070687号明細書を参照されたい。交雑測定に使用する通常の支持体は若干の名前を挙げればニトロセルロースフィルター、ナイロン[ゼータバインド(Zetabind)]フィルター、ポリスチレンビード及びアガロースビード(Agarose bead)を包含する。代表的な不均質測定操作の更に詳細な説明を以下の実施例の1つに記載する。本発明のプロープ、それらの使用方法及び得られる結果を下記の実施例により説明する。

#### 実施例1

具体的説明のために、 $n=5$ の間隔をもつフルオレセインとテキサスレッド成分を含有するポリヌクレオチドプロープの調製を以下のようにして行なった。原料は配列内に5個のヌクレオチドにより分離された2個の第1級アミン官能リンカーアームヌクレオチドを含む合成[25マー(25個)]ポリヌクレオチドプロープ約300 $\mu$ gである。ポリヌクレオチド300 $\mu$ gを0.5モル炭酸水素ナトリウム緩衝溶液(pH=8.8)約20 $\mu$ lに吸



取させた。10  $\mu$ lの水に溶解したテキサスレッド約100  $\mu$ gをポリヌクレオチド溶液へ添加する。制限された反応を0~5℃で約15分間に行なう。この時点で、7モル尿素溶液約10  $\mu$ lを添加し、反応混合物を0.7 cm $\times$ 3.0 cmのG-25セファデックス・カラム(Sephadex Column)で分離する。初期区分(初期排出区分)は未反応ポリヌクレオチド、モノ置換テキサスレッドポリヌクレオチドアローブ及びジ置換テキサスレッドポリヌクレオチドアローブを含有する。最終区分(塔内含有区分)は未反応テキサスレッドを含有する。初期区分をブールし、凍結乾燥し、最終区分を廃棄する。ブールして凍結乾燥した区分を3.5モル尿素の小体積量(5~10  $\mu$ l)に添加し、ゲル電気泳動により分離する。

20%ポリアクリルアミドゲル(7~8モル尿素)上での電気泳動は試料を3種の異なる帯状帯域へ分離し、低部帯状帯域が未反応ポリヌクレオチドであり、中間帯状帯域がモノ置換テキサスレッドポリヌクレオチドであり、上部帯状帯域がジ置

なった。7モルの尿素溶液10  $\mu$ lを添加後、試料を上述のように他のG-25セファデックス・カラム上へ送り、反応したポリヌクレオチドアローブをFITCから分離する。再び、所定の区分をブールし、凍結乾燥する。試料を再度20%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動して2種の帯状帯域へ分離する；低部帯状帯域は未反応モノ置換テキサスレッドポリヌクレオチドアローブであり、上部帯状帯域はフルオレセイン及びテキサスレッドで置換されたポリヌクレオチドアローブである。上部帯状帯域を注意深く取除き、抽出し、凍結乾燥し、上述したようにG-25セファデックス・カラム上で脱塩する。最終的に精製したフルオレセイン-テキサスレッドポリヌクレオチドアローブを次に紫外線/可視光線分光光度計により分析する。260 nm、492 nm及び592 nmでの吸光割合(O.D.)を使用してアローブの正確な化学量論値を測定した；25マーポリヌクレオチドアローブは1個のフルオレセイン成分及び1個のテキサスレッド成分を含有する。

換テキサスレッドポリヌクレオチドである。ポリヌクレオチドをジ置換テキサスレッドポリヌクレオチド誘導体への完全な転化を防止するために反応条件を初めに制御した。この時点で、モノ置換テキサスレッドポリヌクレオチド誘導体を含有する帯状帯域をゲルから注意深く取除き、該誘導体を水で抽出し、得られた溶液を凍結乾燥して乾燥状態とした。凍結乾燥した試料を小体積の水に添加し、G-25セファデックス・カラム上で脱塩した。モノ置換テキサスレッドポリヌクレオチドアローブ含有区分をブールし、凍結乾燥する。

この凍結乾燥物はフルオレセイン成分をモノ置換テキサスレッドポリヌクレオチドアローブへ組込むための第2反応にいつでも使用できる試料である。試料を再び約200  $\mu$ lの0.5モル炭酸水素ナトリウム緩衝溶液(pH=8.8)に添加する。10  $\mu$ lの水中にフルオレセインイソチオシアネート(FITC)約500  $\mu$ gをモノ置換テキサスレッドポリヌクレオチドアローブ含有緩衝溶液へ添加する。反応を約2時間にわたり0~5℃で行

1個の蛍光団を含有するアローブの合成及び精製は容易である。原料はアローブ内の所定の位置で組込まれた1個だけアミン官能化されたリンカーアームヌクレオチドを備える25マーポリヌクレオチドアローブである。テキサスレッド及びFITCの場合において、反応は長時間(約2時間)にわたり行なわれ、蛍光団置換アローブの収率を増加させる。精製のための次工程は上述と同様である。

#### 実施例 2

蛍光団成分間の分離が $n=0$ 、 $n=1$ 、 $n=5$ 、 $n=6$ 、 $n=9$ 及び $n=12$ である一連のフルオレセイン-テキサスレッド25マーポリヌクレオチドアローブ(F&TRアローブ)を調製した。アローブは単純性疱疹ウイルス(タイプ1)標的DNAへ交雑するために設計された。操作は上述に説明した14Aのリンカーアームを使用する実施例1と同様であった。 $n=5$ 、F&TRアローブの実際の配列及び蛍光団の相対位置を以下に示す。



蛍光団はアローブ上のどのリンカーアーム位置を占有することができることを指摘しなければならない。しかし、アローブは1個のフロオレsein及び1個のテキサスレッドのみを含む。蛍光分析は0.01モルリン酸ナトリウム、0.1モル塩化ナトリウム緩衝溶液(pH=7.6)250μl中にF&TRアローブ200ng~2μgを含む試料上で行なわれた。

蛍光発光スペクトルは供与体(フロオレsein)の最大励起波長約490nm、及び受容体(テキサスレッド)の約最大励起波長約590nmで各試料について得られた。全ての値は一連のF&TRアローブのそれぞれについての蛍光励起スペクトルをも得ることによって確認された。受容体の蛍光発光に関して観察されたエネルギー転移効率は490nmで励起(供与体すなわちフロオレseinの励起)したF&TRアローブの615nmでの蛍光発光と590nmで励起(受容体すなわちテキサ

スレッドの励起)した1個の標識のテキサスレッドアローブ(TRアローブ)の615nmでの蛍光発光の比を100倍することによって測定した。

観察されたエネルギー転移効率=

$$\frac{(\text{EX490nmでのF\&TRアローブのEM615nm})}{(\text{EX590nmでのTRアローブのEM615nm})} \times 100$$

従って、値75はF&TRアローブが490nmで励起された場合に、590nmで励起されたTRアローブと等量(テキサスレッドに関して)の蛍光発光(615nm)の75%を生ずることを意味する。観察されたエネルギー転移効率は相補的標的ボリヌクレオチドへ交雑している一連の完全なF&TRアローブと未交雑F&TRアローブについて測定された。一連のF&TRアローブについての結果を以下の表Aに記載する。

表 A

フルオレsein-テキサスレッドアローブについて観察されたエネルギー転移効率

F&TRアローブ (N)	未交雑	交雑
0	25	17
1	29	31
5	35	82
6	39	59
9	50	30
12	17	13
TRアローブ (EX590nm)	100	100

表Aの結果は観察されたエネルギー転移効率が一連の交雑したF&TRアローブの中でn=5、F&TRアローブについて最高(82)であることを示す。一連の交雑したF&TRアローブの中で、エネルギー移動はフェルスター方程式から予想されるように長い供与体-受容体距離(n=6、9、12)をもつアローブについて減少することが観察された。しかし、予想外にも、該エネルギー転移効率はより近い供与体-受容体距離すなわちn=0及びn=1をもつアローブについてもまた低下する。

一連のF&TRアローブは予想されるタイプの挙動に従わない。高エネルギー転移効率はほぼ20~30人の間の比較的制約された位置についてのみ観察される。これらの高効率はn=3及びn=4位置並びに実験的に証明されたn=5及びn=6やn=7位置をも包含すると思われる。

また、表Aは未交雑F&TRアローブの結果が交雑アローブの結果と同様であるが、余りはっきりしないことを示す。未交雑アローブについても、n=0及びn=1の値はフェルスター方程式から予想される値より低い。観察された最高効率値は50であり、これはn=9F&TRアローブについてである。交雑はn=5位置またはn=5近くでより高い観察される合計エネルギー転移効率を導く改善された環境を提供し、且つn=0及びn=1位置で該エネルギー転移効率の低下を生ずる。

### 実施例3

2個の25マーアローブ2組を実施例2と同様の操作及びリンカーアームを使用して調製した。フルオレsein-テキサスレッドの最終分離(標

的ポリヌクレオチドへの交雑する場合)は $n=0$ 及び $n=6$ 塩基対単位であった。

相補的標的ポリヌクレオチドへ交雑したプローブセット1( $n=0$ )及びプローブセット2( $n=6$ )の蛍光分析についての結果を表Bに記載する。

表 B

標的ポリヌクレオチドへ交雑した2個プローブ(フルオレセインプローブ及びテキサスレッドプローブ)について観察されたエネルギー転移効率

プローブ セット	塩基対 間隔(n)	(発光615nm 励起490nm)
1	0	15
2	6	52

表Bの結果はプローブセット2( $n=6$ )について観察されるエネルギー転移効率が高く、また、プローブセット1( $n=0$ )について予想外に低いことを示すものである。2個のプローブ系についての結果は一連の1個のF&TRプローブについて得られる結果を確認するものである。再び、2個のプローブの結果は最適位置が $n=6$ 塩基対間隔付近の非常に狭い範囲内にあることを示すものである。

#### 実施例5

本実施例は単純性疱疹ウイルスDNAを検出するためにサンドイッチタイプの不均質測定フォーマット中への実施例2の1個のプローブの使用に関する。技術的背景として、サンドイッチタイプ測定法は支持体(例えばポリスチレンビードまたはアガローゼビード)上に固定された相補的プローブ(捕捉プローブ)により所定の標的ポリヌクレオチドを交雑することによる初期捕捉を包含する。今、捕捉(交雑により固定)された標的ポリヌクレオチドをリポーターグループ(フルオレセイン等)で標識された他の相補的プローブと接触させる。今、交雑されたりポーターグループは標的ポリヌクレオチド配列の存在の信号を発生する。

測定操作において、約50~100個のアガローゼ単純性疱疹ウイルス(HSV)捕捉ビード(直径約100ミクロン)を使用する。アガローゼHSV捕捉ビードはアガローゼビードの活性化形態へ所定の相補的HSVプローブ(20~50個ヌクレオチド鎖長)を置換(共有結合)することに

#### 実施例4

$n=5$ ヌクレオチド間隔をもち、供与体としてルシファーイエロー、受容体としてテキサスレッドを含む25マープローブ(LY&TRプローブ)を上述の基本操作を使用して調製した。435nmで励起した場合の615nmでの発光に関して観察されたエネルギー転移効率は約20%と見出された。相対値は $n=5$ F&TRプローブについての82%より低い。この低相対値はルシファーイエローの消衰係数がフルオレセインより顕著に低く、すなわちルシファーイエローについて約12,000であるのに対し、フルオレセインについて75,000であるとの事実によるものである。この特性のために、ルシファーイエローはフルオレセインと同様に供与体として良好なものではない。しかし、ルシファーイエロー/テキサスレッド対は大きなストークシフト(約170nm)を生じ、且つ供与体はレーザー(ヘリウム-カドミウム)、約442nmにより励起させることができる。

より調製される。単純性疱疹ウイルスDNAを含む試料DNA(約1~10mg)を最終体積約100 $\mu$ lの交雑緩衝溶液[0.75モル塩化ナトリウム、0.075モルクエン酸ナトリウム、1%(w/v)硫酸ドデシルナトリウム(SDS)、500 $\mu$ g牛血清アルブミン(結晶性ペンテックスフラクションV)、500 $\mu$ gポリビニルピロリドン]中で調製した。

アガローゼHSV捕捉ビードをDNA試料溶液へ添加する。試料溶液を穏やかに攪拌し、交雑を45~55℃で15~30分間にあたり行なった。次に、ビードを濾過または遠心分離により試料溶液から分離する。アガローゼHSV捕捉ビードを2 $\mu$ lの1 $\times$ SSC+0.1%SDS緩衝溶液(0.15モル塩化ナトリウム、0.015モルクエン酸ナトリウム、0.1%(w/v)SDS、pH=7.15、45~50℃)で3回洗浄する。アガローゼHSV捕捉ビードは10~100ngのフルオレセイン-テキサスレッドHSV25マープローブ(実施例2)を含む他の交雑緩衝溶液100 $\mu$ l

中に懸濁する。交雑は再度45～55℃の温度で15～30分間にわたり穏やかに攪拌しながら行なう。ビードを尹過または遠心分離により溶液から分離する。ビードを2 mlの1×SSC+0.1%SDS緩衝溶液(45～55℃)で最初に3回、次に1×SSC緩衝溶液で3回洗浄する。ビードを蛍光分析用の顕微鏡スライドまたは所定の試料セルへ移す。蛍光分析は光子計測用エビ蛍光体顕微鏡装置を用いて行なう。励起はアルゴンイオンレーザー、高強度水銀(Hg)アークランプまたは480～490 nmで励起するために適当なフィルターを付けた他の高強度光源を用いて行なう。エビ蛍光体顕微鏡は615～630 nmの領域での蛍光発光を監視するための所定の二色鏡及びフィルターを備える。蛍光発光は顕微鏡に備えられた光子計測用光電子増倍装置を使用して定量する。蛍光プローブが交雑した標的DNAを含むアガロゼビードを1～10秒間にわたり計測する。通常、試料1種類当たり10～15個のビードを計測する。試料の蛍光分析の合計時間は5分以内である。

アガロゼビード試料を蛍光分析するための第2の方法は光学繊維光源によるビードの側照明を包含する。この操作において、励起光は顕微鏡に入らないが、ビードの側照明について試料セル(スライド)中に配置された50～100ミクロンの光学繊維に収束される。励起光は外部すなわち顕微鏡の対物レンズに対して90°の角度にある。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図～第5図は本発明を実施する際に使用するストークシフトプローブの好適な実施態様を説明する図である。

特許出願人代理人 曾 我 道 照

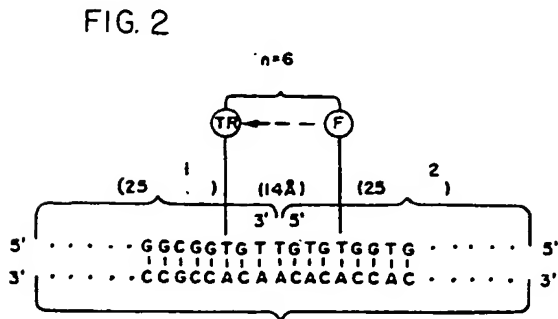
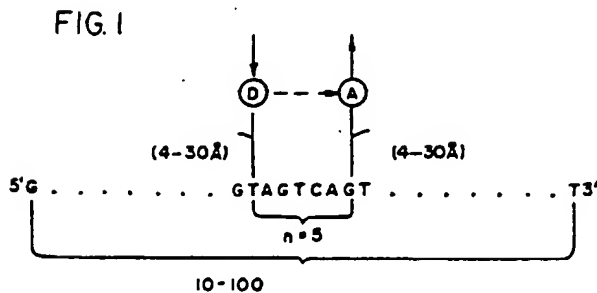


FIG. 3

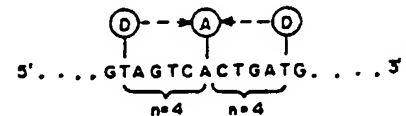


FIG. 4

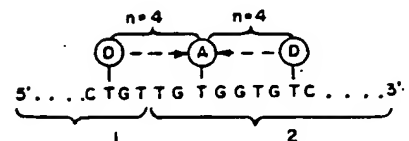
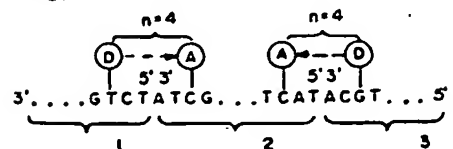


FIG. 5



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**